

539,805

(1) 協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年7月1日 (01.07.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/055511 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 33/00 周南市 新宮町1番1号 Yamaguchi (JP). 伊藤 真治 (ITO,Shinji) [JP/JP]; 〒745-0843 山口県 周南市 新宮町1番1号 Yamaguchi (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/015992
- (22) 国際出願日: 2003年12月12日 (12.12.2003) (74) 代理人: 大谷 保, 外(OHTANI,Tamotsu et al.); 〒105-0001 東京都 港区 虎ノ門三丁目25番2号 ブリヂストン虎ノ門ビル6階 大谷特許事務所 Tokyo (JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): CA, US.
- (30) 優先権データ: 特願 2002-366721 (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).
- 2002年12月18日 (18.12.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 出光石油化学株式会社 (IDEMITSU PETROCHEMICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒130-0015 東京都 墨田区 横綱一丁目6番1号 Tokyo (JP). 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 田代 裕統 (TASHIRO,Hironori) [JP/JP]; 〒745-0843 山口県
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF MEASURING BIODEGRADATION RATE OF UNNATURAL ORGANIC COMPOUND

(54) 発明の名称: 非天然系有機化合物の生分解率の測定方法

(57) Abstract: A method of measuring the biodegradation rate of an unnatural organic compound characterized by comprising, in the biodegradation of the unnatural organic compound in a biodegradation medium, measuring the radioactive carbon isotope ^{14}C level in the biodegradation medium and measuring the biodegradation rate of the unnatural organic compound based on the difference between the ^{14}C level thus measured and the ^{14}C level of the present carbon. It is also possible to employ a metal such as iron in the medium as an internal standard. According to this method, the biodegradation rate of an unnatural organic compound can be safely, conveniently, quickly and highly accurately measured without resort to any special measure to radiation.

(57) 要約: 生分解培地の存在下での非天然系有機化合物の生分解において、生分解培地中の放射性炭素同位体 ^{14}C の濃度を測定し、該 ^{14}C 濃度と現代炭素における ^{14}C 濃度との差異から非天然系有機化合物の生分解率を測定することとを特徴とする、非天然系有機化合物の生分解率の測定方法である。培地中の鉄などの金属を内部標準に使用することもできる。この方法によれば、非天然系有機化合物の生分解率を、特別な放射線対策を施すことなく安全で簡便かつ迅速に、しかも精度よく測定することができる。

WO 2004/055511 A1

明 細 書

非天然系有機化合物の生分解率の測定方法

技術分野

本発明は、非天然系有機化合物の生分解率の測定方法に関する。さらに詳しくは、非天然系有機化合物の生分解率を、放射性炭素同位体 ^{14}C の現代炭素からの変化を利用して、安全で簡便かつ迅速に、しかも精度よく測定する方法に関する。

背景技術

有機化合物の生分解率を直接測定するためには、先ず、試料中に放射性炭素同位体 ^{14}C を有機化学的に富化する必要がある。つぎに、この放射性炭素同位体 ^{14}C を富化した試料を生分解させ、その生分解に伴って生成する二酸化炭素の放射線量をシンチレーションカウンタによって測定することにより、その有機化合物の生分解によって生成した二酸化炭素中の放射性炭素同位体 ^{14}C の絶対量を求め、使用した放射性炭素同位体 ^{14}C 富化試料中の該 ^{14}C の絶対量との比をとることによって、有機化合物の生分解率を測定する方法である。

ところが、この測定方法においては、放射性の ^{14}C を使用するために、一連の測定操作のすべてを放射線対策の施された空間において実施する必要がある。生分解に伴って生成する二酸化炭素の放射線量の測定に長時間を要するほか、このために放射線量の測定時にバックグラウンド放射能などの外乱による誤差が生じやすいという問題があった。

そこで、このような非天然系有機化合物の生分解率を測定するに際して、測定試料を高価な放射性炭素同位体 ^{14}C で富化することなく、また特別な放射線対策を施す必要がなく、さらに迅速かつ高い精度で、その生分解率を測定することのできる方法の開発が望まれていた。

発明の開示

本発明は、非天然系有機化合物の生分解率を、特別な放射線対策を施すこと

なく安全で簡便かつ迅速に、しかも測定誤差が少なく精度よく測定することのできる方法を提供することを目的とするものである。

本発明者らは、このような課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、非天然系有機化合物中には崩壊性の放射性炭素同位体 ^{14}C は崩壊しきって残存していないことを利用し、生分解を行なう際の測定試料を混合した培地からの二酸化炭素中の該 ^{14}C 濃度を測定し、該 ^{14}C 濃度と現代炭素の ^{14}C 濃度との差異を測定することより、非天然系有機化合物の生分解率が測定できることを見出した。さらに、生分解培地中に含まれている金属を内部標準として利用することにより、従来は不可能であった開放されたフィールドでの生分解率の測定ができることを見出し、これら知見に基づいて本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明の要旨は、下記のとおりである。

(1) 生分解培地の存在下での非天然系有機化合物の生分解において、生分解培地中の放射性炭素同位体 ^{14}C の濃度を測定し、該 ^{14}C 濃度と現代炭素における ^{14}C 濃度との差異から非天然系有機化合物の生分解率を測定することを特徴とする非天然系有機化合物の生分解率の測定方法。

(2) 内部標準を用いて生分解率を測定することを特徴とする、前記(1)に記載の非天然系有機化合物の生分解率の測定方法。

(3) 内部標準が、鉄、銅、およびマンガン等の生体必須金属からなる群から選ばれる金属であることを特徴とする、前記(2)に記載の非天然系有機化合物の生分解率の測定方法。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の実施に用いる生分解反応装置の一例の説明図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明の非天然系有機化合物の生分解率の測定方法は、非天然系有機化合物の生分解培地存在下での生分解において、生分解培地中の放射性炭素同位体 ^{14}C の濃度を測定し、該 ^{14}C 濃度と現代炭素における ^{14}C 濃度との差異から非天然系有機化合物の生分解率を測定することを特徴とする非天然系有機化合物の

生分解率の測定方法である。

本発明において生分解率の測定に利用される非天然系有機化合物とは、例えば、石油、石炭、天然ガスなどの化石燃料を原料として合成された様々な石油化学製品や石炭化学製品などの各種の有機化合物である。これら非天然系有機化合物の中でも、例えば、合成洗剤などのように使用後に排水と共に自然界に流出して河川や湖沼の水質を汚染するなど、自然環境に悪影響を及ぼすおそれの大きい物質については、特にその自然界での微生物による生分解の進行の状況を調べる必要性の高い物質である。

ここで、天然系の炭素含有物質、例えば大気中の二酸化炭素や植物体においては、1モルの炭素は 6.0×10^{23} 個であるが、炭素中の ^{14}C 濃度は、 ^{12}C に対する ^{14}C の存在比が 10^{-12} 分の1であることから、放射性炭素同位体 ^{14}C は 6×10^{11} 個である。そして、この放射性炭素同位体 ^{14}C の半減期は、 $5,730 \pm 40$ 年であることから、これら 6×10^{11} 個の放射性炭素同位体 ^{14}C がすべて崩壊するまでの期間としては、22.6万年が必要である。したがって、大気中の二酸化炭素を植物などの生物体内に取り込んで固定化した後、地中で22.6万年以上経過した石炭や天然ガス、石油などの化石燃料においては、これらの中に含まれていた炭素中の放射性炭素同位体 ^{14}C はそのすべてがすでに崩壊していることとなる。

そして、本発明においては、このようにすでに崩壊して放射性炭素同位体 ^{14}C を含有しない化石燃料を原料として合成された石油化学製品や石炭化学製品などの各種の非天然系有機化合物について、微生物などによる生分解率を測定し、その結果より、これら物質の自然界における生分解過程を追跡することができるようにするものである。

ここで、 ^{14}C 濃度の表記法として、国際的な取決めにより1950年時点の循環炭素中の ^{14}C 濃度を100%として計算される値があり、これをpMC (percent Modern Carbon) と呼ぶ。1950年以降、大気中の二酸化炭素の中の放射性炭素同位体 ^{14}C の濃度は変動しており、現代(2002年)の炭素における ^{14}C 濃度は110~111%の範囲内にある。

つぎに、本発明の方法を実施するにあたっては、例えば、第1図に示すよう

に構成された生分解反応装置を用いて、化石燃料を原料として合成された石油化学製品などの非天然系有機化合物である生分解率を測定するための試料と、放射性炭素同位体 ^{14}C を含有する天然物であって試料の非天然系有機化合物の生分解を生じさせる作用を持つ物質、例えば、堆肥や活性汚泥、土壌懸濁液などを混合して反応槽 1 内に入れ、この反応槽 1 内の底部近傍に、大気中の二酸化炭素を完全に除去した空気を導入しながら、所定の温度において、試料の生分解反応を実施する。

そして、この反応槽 1 に供給する空気は、第 1 図に示すように水酸化ナトリウム水溶液などを入れた二酸化炭素吸収槽 2 と、水洗槽 3 を経由して、反応槽 1 に導入することによって、大気中の二酸化炭素が反応系内に入り込まないようにする。また、この反応槽 1 に導入された空気は、生分解反応において消費された一部を除き、生分解反応で生成した二酸化炭素と共に反応槽 1 の頂部近傍より、貯留槽 4、第 1 段トラップ 5、第 2 段トラップ 6 に導入される。

このようにして、生分解反応を所定期間、例えば 10 日間実施した後、生分解した試料の非天然系有機化合物を含む培地を、同様に二酸化炭素を除いた空气中、または純酸素中で燃焼してこれを二酸化炭素に変換し、この二酸化炭素を同様にして水酸化ナトリウム水溶液などを通して吸収させて捕捉する。その後、シンチレーションカウンターあるいは加速器質量分析計を用いて二酸化炭素中の放射性炭素同位体 ^{14}C の含有率 (pMC) を測定することができる。

測定する試料の生分解率は、上記のようにして求めた試料を含む培地の生分解前と生分解後の pMC と、試料の非天然系有機化合物を全く添加することなく、肥料などの天然物のみからなる培地を使用して、同様に処理して求めた放射性炭素同位体 ^{14}C の含有率 (対照培地の pMC) の値を求めて、これらの値を使用して、以下のような計算式によって求めることができる。

生分解培地中の ^{14}C 濃度からの排出炭酸ガス量基準の算出法：

$$B = \frac{(\text{分解前対照培地の pMC}) - (\text{分解前試料培地の pMC})}{(\text{分解前対照培地の pMC})} \quad (1)$$

$$C = \frac{(\text{分解後対照培地の } pMC) - (\text{分解後試料培地の } pMC)}{(\text{分解後対照培地の } pMC)} \quad (2)$$

ただし、対照培地の pMC は、分解前と分解後とでその値は変化しない。

分解前の試料培地の炭素量 (D)

$$D = \frac{\text{試料由来の炭素量 (g)}}{B} \quad (3)$$

分解後の試料培地の炭素量 (E)

$$E = D - \text{試料培地の排出二酸化炭素量 (g)} \times \frac{12}{44} \quad (4)$$

$$\text{生分解率 (\%)} = \left[1 - \frac{E \times C}{D \times B} \right] \times 100 \quad (5)$$

$$= \left[1 - \frac{E \times C}{\text{試料由来の炭素量 (g)}} \right] \times 100 \quad (6)$$

また、本発明の方法においては、前記の生分解を行なう培地の中に鉄、銅、マンガンなどの金属種が含まれており、これらの金属種は生分解操作を行っても生分解されず、揮発等も起こらないので、これらの金属種の総量は生分解操作の前後においてほとんど変化しない。したがって、この性質を利用して生分解培地中の金属種を内部標準として使用して、次の計算式によっても生分解率を求めることができる。

$$H = \frac{F}{G} \times D \quad (7)$$

$$E = \frac{J}{I} \times K = \frac{J}{I} \times \frac{F}{G} \times D \quad (8)$$

上記の計算式における各記号の意味は以下のとおりである。

F : 分解前対照培地の金属濃度

G : 分解前対照培地の炭素濃度

I : 分解後対照培地の金属濃度

J : 分解後対照培地の炭素濃度

D : 分解前対照培地の炭素量 (g)

E : 分解後対照培地の炭素量 (g)

H : 分解前対照培地の金属量 (g)

K : 分解後対照培地の金属量 (g)

なお、金属を内部標準として用い、 $K=H$ とする。

この方法による場合には、前述のような生分解で発生する二酸化炭素を捕集する必要がないため、密閉した反応層の中で生分解を行なう必要がなく、大気中に開放された装置で測定することができるという利点がある。

つぎに、実施例により本発明をさらに詳細に説明する。

〔実施例 1〕

生分解反応装置として、第 1 図にその概略を示す装置を用い、堆肥中におけるポリカプロラク톤の生分解試験を行なった。

天然物として含水率 65 質量%の堆肥 171.4 g、含水率 20 質量%の水洗した海砂 (25～35 メッシュ) 400.0 g、および非天然系有機化合物としてポリカプロラク톤 (以下、「PCL」と記載する) 5.0 g をよく混ぜ合わせて生分解培地を作成し、分析用に全体の 4 質量%をサンプリングし、残りを反応槽 1 に充填した。

ついで、この反応槽 1 を 58℃の恒温槽に装入し、低圧の空気を、二酸化炭素吸収槽 2 と水洗槽 3 を通して大気中の二酸化炭素を除去してから、反応槽 1 の底部近傍まで差し込んだ空気導入管より導入した。二酸化炭素吸収槽 2 には、2 規定濃度の水酸化ナトリウム水溶液を入れて大気中の二酸化炭素を吸収させた。また、空気の通気量は、30 ミリリットル/分とした。また、反応槽 1 の頂部近傍から余剰の空気および反応槽 1 内での生分解反応により生成した二酸化炭素を導管により貯留槽 4 に導入し、貯留槽 4 の出口からの導管を第 1

段トラップ 5 の水酸化ナトリウム水溶液中に導入した。この第 1 段トラップ 5 の下流側に第 2 段トラップ 6 を設けて、余剰空気のみを大気に放出した。

このようにして 11 日間にわたり、PCL を堆肥中において生分解させた。この生分解後の培地を、燃焼炉において上記の生分解反応装置と同様の二酸化炭素吸収槽を通して二酸化炭素を除去した空気を用いて燃焼し、燃焼ガスを水酸化ナトリウム水溶液を入れたトラップで捕捉し、この水溶液中の二酸化炭素の量及びその pMC 値を求めた。

同様に、生分解前に採取した培地のサンプルについても、燃焼炉において燃焼し、二酸化炭素の pMC 値を求めた。また、生分解前に採取した培地と、生分解後の培地について、その中の鉄分 (Fe) 濃度と全炭素濃度を測定した。

また、比較例として、上記の生分解反応装置と同じ構成の生分解反応装置を用いて、この装置の反応槽 1 に、非天然系有機化合物である PCL を加えない他は、上記の生分解反応と同一の条件下に、11 日間の堆肥のみの生分解反応を行った。この場合も生分解前に採取した培地のサンプルと、生分解後の培地について、実施例 1 と同様にして二酸化炭素の量及び pMC 値を求めた。

これらの結果を表 1 に示す。

表 1

	実施例	比較例
分解前培地の pMC (%)	105.19	115.82
分解後培地の pMC (%)	113.01	*
分解前培地の Fe 濃度 (ppm)	50	—
分解後培地の Fe 濃度 (ppm)	66	—
分解前培地の炭素濃度 (%)	6.87	—
分解後培地の炭素濃度 (%)	5.22	—

* : 分解前と変化なし

これらの結果を用いて、前記式（１）～式（６）を用いて、培地からの排出二酸化炭素量を基準とした場合の生分解率をもとめ、前記式（７）、（８）から内部標準基準の場合の生分解率を求めた。これらの結果を表２に示す。

表 2

算出法	生分解率（％）
排出CO ₂ 量基準	77
内部標準基準	80

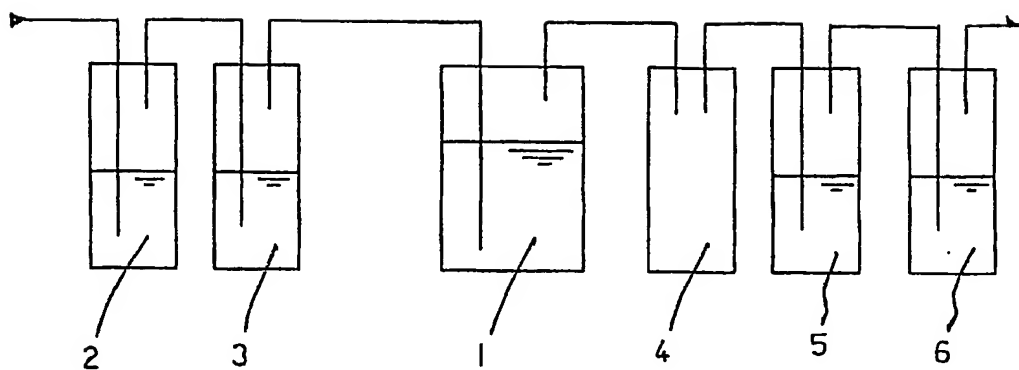
産業上の利用の可能性

本発明によれば、非天然系有機化合物の生分解率を安全で簡便かつ迅速に、しかも精度よく測定することのでき、また、内部標準を利用した方法の場合には、更に大気中に開放された装置で測定することができるという効果も有する非天然系有機化合物の生分解率の測定方法を提供することができる。

請 求 の 範 囲

1. 生分解培地の存在下での非天然系有機化合物の生分解において、生分解培地中の放射性炭素同位体 ^{14}C の濃度を測定し、該 ^{14}C 濃度と現代炭素における ^{14}C 濃度との差異から非天然系有機化合物の生分解率を測定することを特徴とする、非天然系有機化合物の生分解率の測定方法。
2. 内部標準を用いて生分解率を測定することを特徴とする、請求項 1 に記載の非天然系有機化合物の生分解率の測定方法。
3. 内部標準が、鉄、銅、およびマンガン等の生体必須金属からなる群から選ばれる金属であることを特徴とする、請求項 2 に記載の非天然系有機化合物の生分解率の測定方法。

第 1 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP03/15992

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ G01N33/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ G01N33/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2004	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JOIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LARSON R.J., "Comparison of biodegradation rates in laboratory screening studies with rates in natural waters", Residue Reviews, Vol.85, pages 159 to 171, (1983)	1
A		2-3
A	JP 5-180830 A (Showa Shell Sekiyu Kabushiki Kaisha), 23 July, 1993 (23.07.93), (Family: none)	1-3

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
12 April, 2004 (12.04.04)Date of mailing of the international search report
27 April, 2004 (27.04.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2004年
日本国登録実用新案公報	1994-2004年
日本国実用新案登録公報	1996-2004年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JOIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	LARSON R J, "Comparison of biodegradation rates in laboratory screening studies with rates in natural waters", Residue Reviews, Vol.85, p.159-171, (1983)	1 2-3
A	J P 5-180830 A (昭和シェル石油株式会社) 1993.07.23 (ファミリーなし)	1-3

☐ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.04.2004

国際調査報告の発送日

27.4.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

竹中 靖典

2 J

9507

電話番号 03-3581-1101 内線 3251